

Kultury izolovaných embryí

8.

Jaroslava Dubová

Ústav experimentální biologie
Oddělení fyziologie a anatomie rostlin
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita

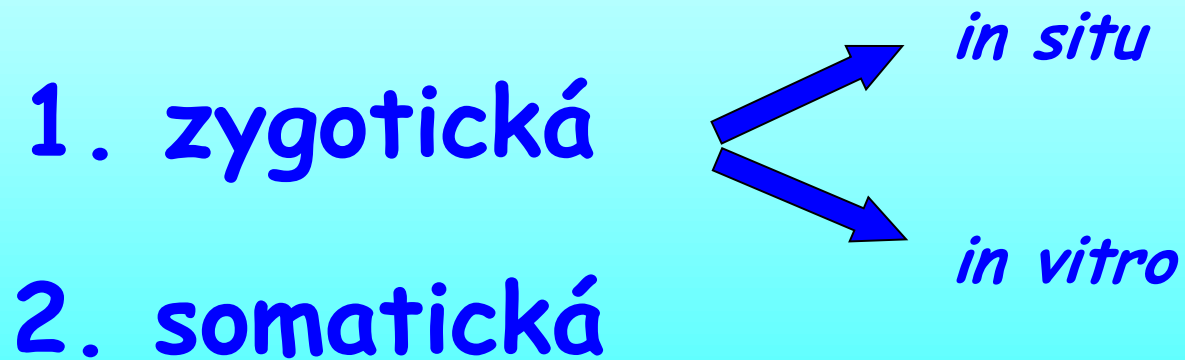


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

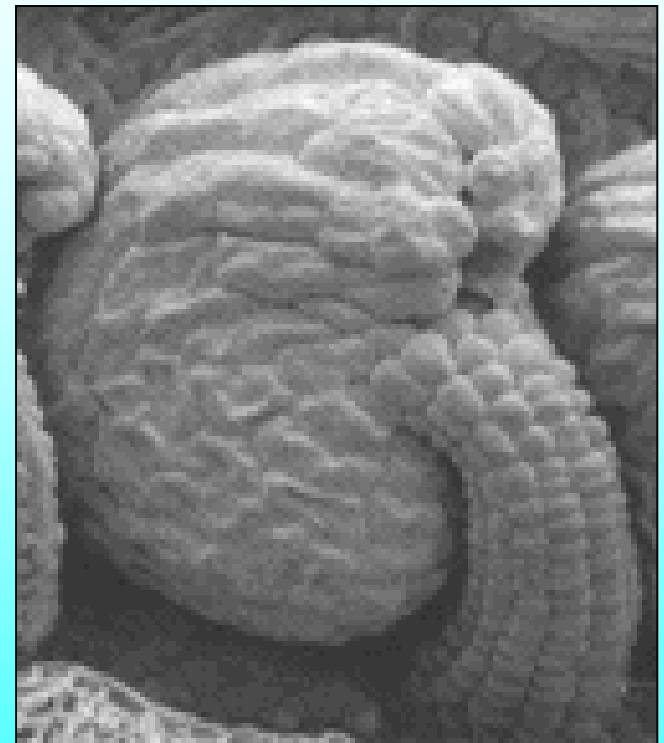
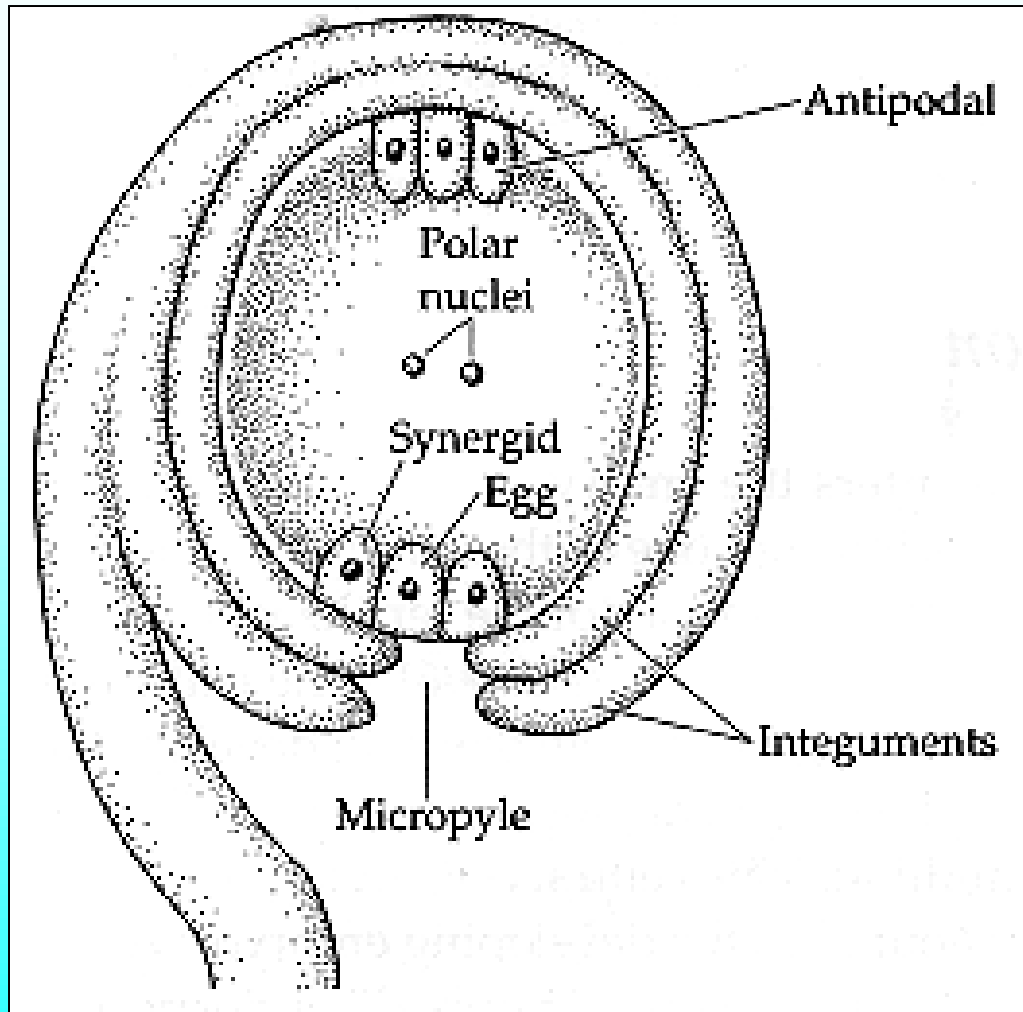
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Krytosemenné rostliny

Vývoj embrya = embryogeneze



Anatropní vajíčko - schéma



vajíčko *Arabidopsis*

Co předchází embryogenezi?

Makrosporogeneze = tvorba makrospor

♀ samičí archespor



makrosporocyt



Meióza I,II

tetráda haploidních makrospor

(♂ podobně u samčího gametofytu mikrosporogeneze = tvorba mikrospor)

Co předchází embryogenezi?
♀ Makrogametogeneze
a tvorba zárodečného vaku

(a podobně ♂ mikrogametogeneze = tvorba pylových zrn)

tetráda haploidních makrospor



fungující makrospora (makrospory)



mitotická dělení

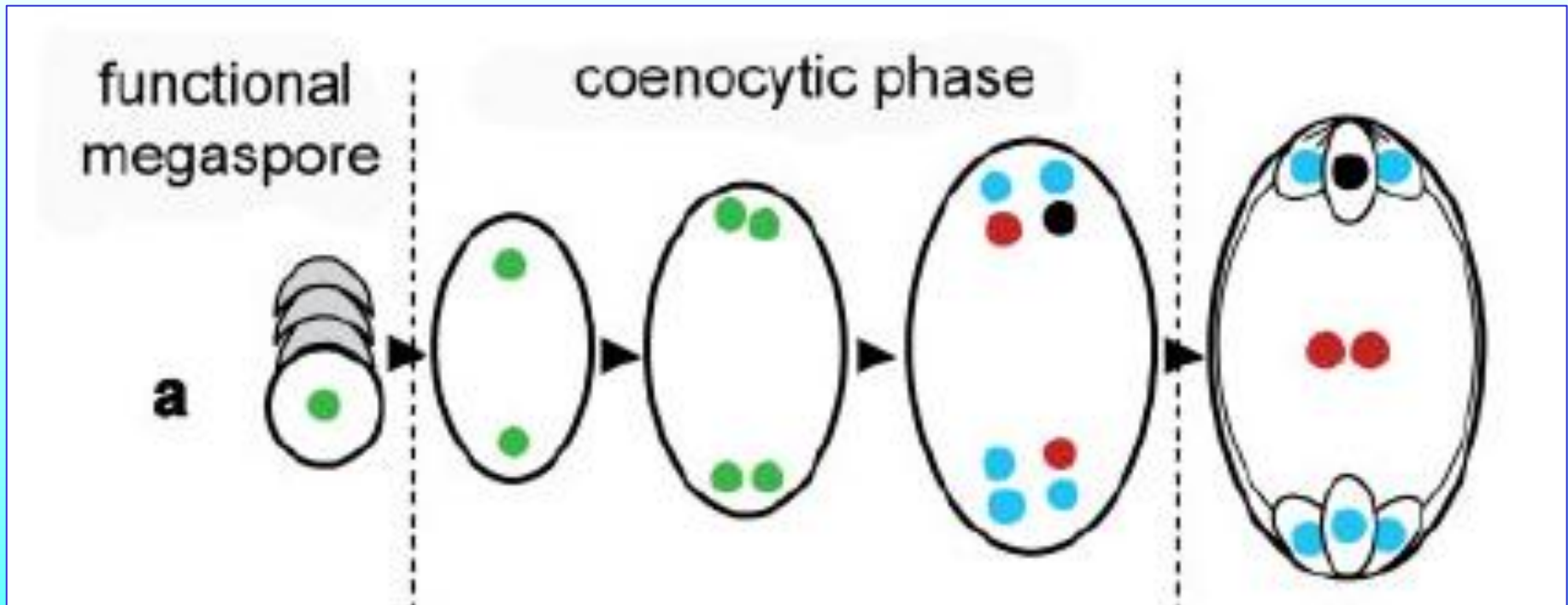
mladý zárodečný vak



diferenciace buněk

zralý zárodečný vak = samičí gametofyt
monosporický, bisporický, tetrasporický

Vývoj zárodečného vaku typ *Polygonum*



Co předchází embryogenezi?
opylení, oplození a vývoj zygoty

details podrobněji viz Rostlinná embryologie

Embryogeneze - krytosemenné rostliny

Rostlinné embryo je charakterizováno svým **původem**, svou **morfologií** a svým **vývojem** v čase.

Původ: **zygotická embrya** vznikají ze zygoty, která je výsledkem fúze gametických buněk (vaječná a spermatická buňka)

somatická embrya (syn. asexuální embrya, adventivní embrya, embryoidy) se vyvíjejí ze somatických buněk

Morfologie: plně vyvinuté embryo je **bipolární struktura** se **stonkovým meristémem** na jednom konci a **kořenovým meristémem** na konci druhém; dále je charakterizováno specifickým typem listů, tzv. **dělohami**.

Vývoj embrya v čase

je charakterizován sledem typických morfologických stadií

vývojová stadia embrya u **dvouděložných rostlin:**

zygota

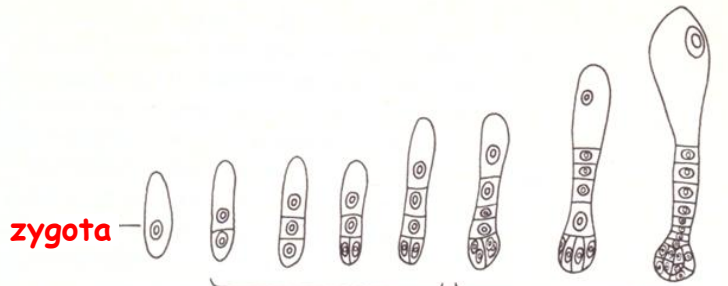
globulární embryo

srdcovité embryo

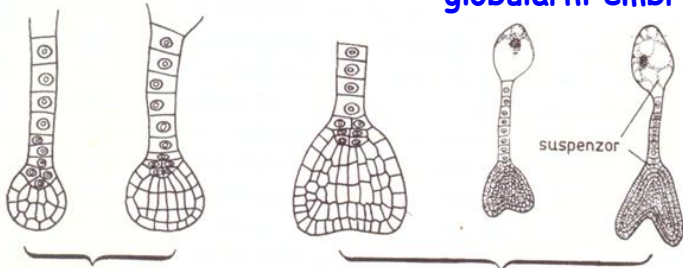
hruškovité (torpédovité)

zralé embryo

Embryogeneze *Capsella bursa-pastoris*

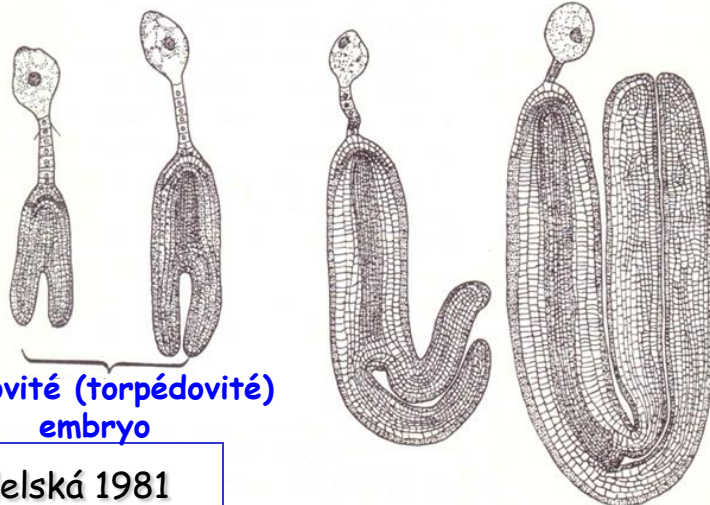


lineární embryo globulární embryo



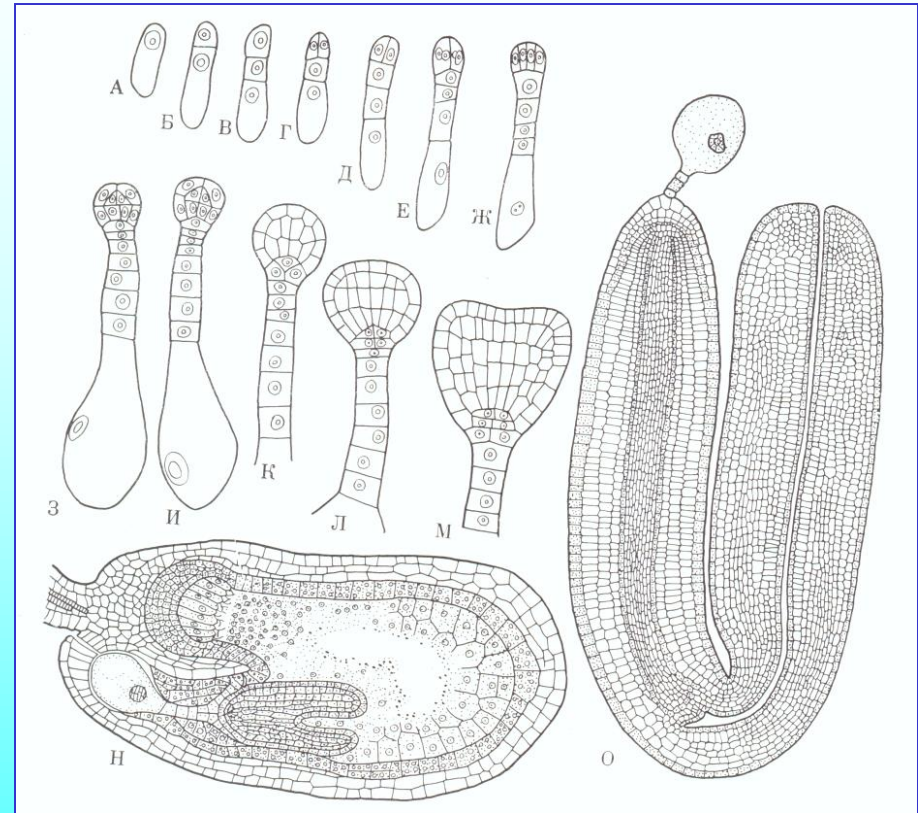
globulární embryo

srdcovité embryo



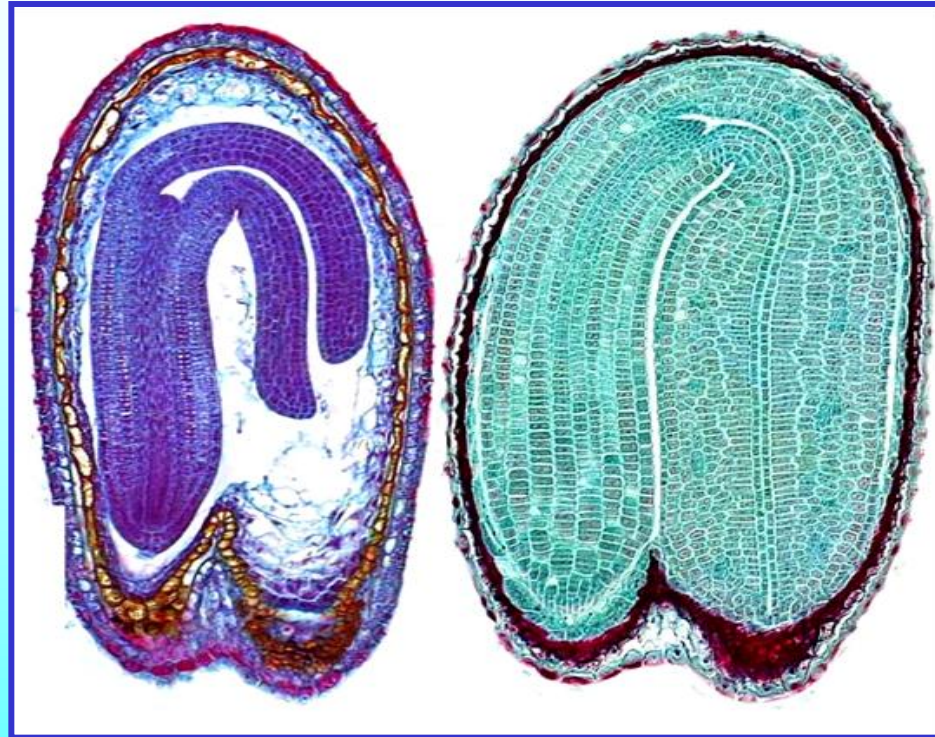
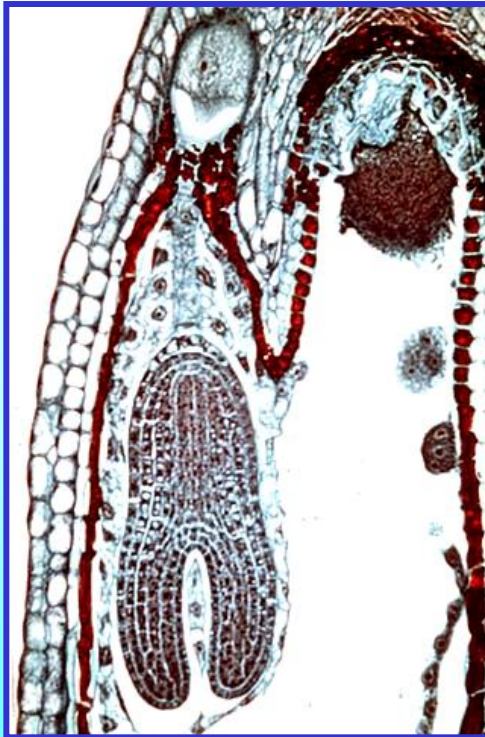
hruškovité (torpédovité) embryo

Erdelská 1981



Poddubnaja-Arnoldi 1976

Capsella bursa-pastoris - vývojová stadia embrya



globulární embryo

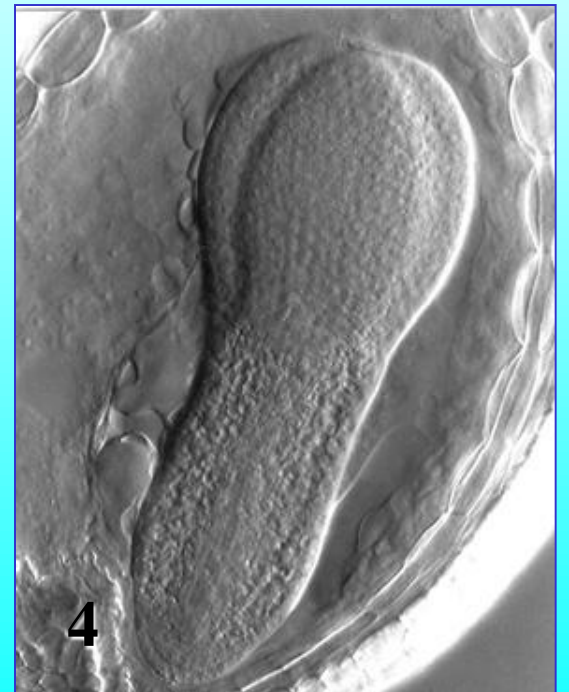
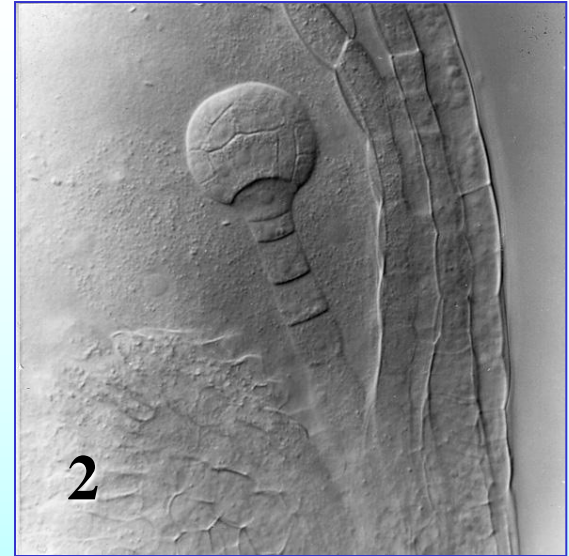
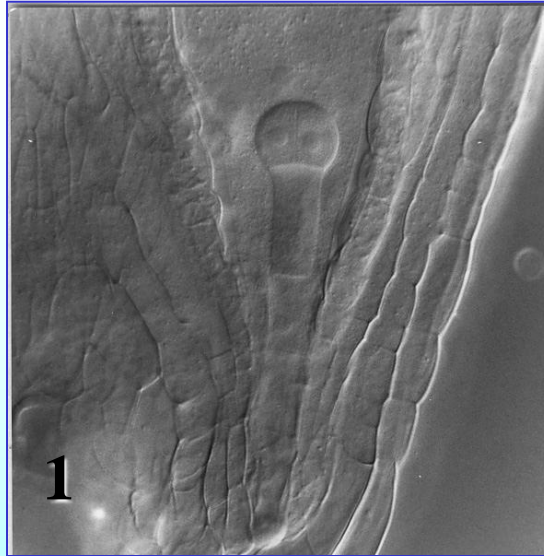
torpédovité embryo

starší torpédovité
embryo

zralé embryo

Embryogeneze *Arabidopsis* - Nomarski DIC

- 1 preglobulární
- 2 globulární
- 3 srdcovité
- 4 torpédovité

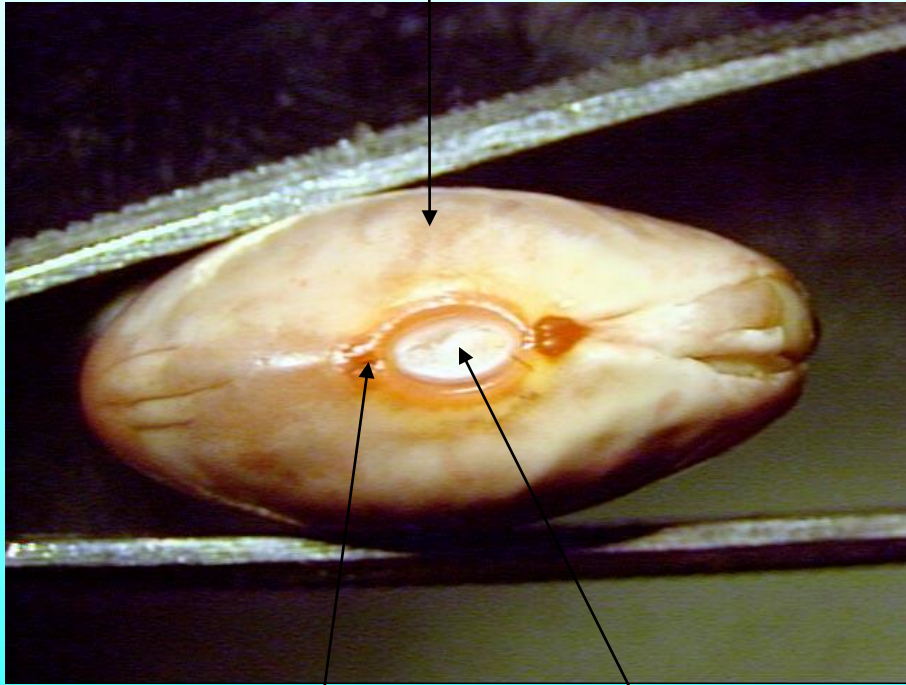


DM Vernon and D Meinke (1994)
Dev. Biol. 165: 566-573.

Photos by DM Vernon

Semeno a embryo fazolu *Phaseolus vulgaris* L.

osemení
(testa)

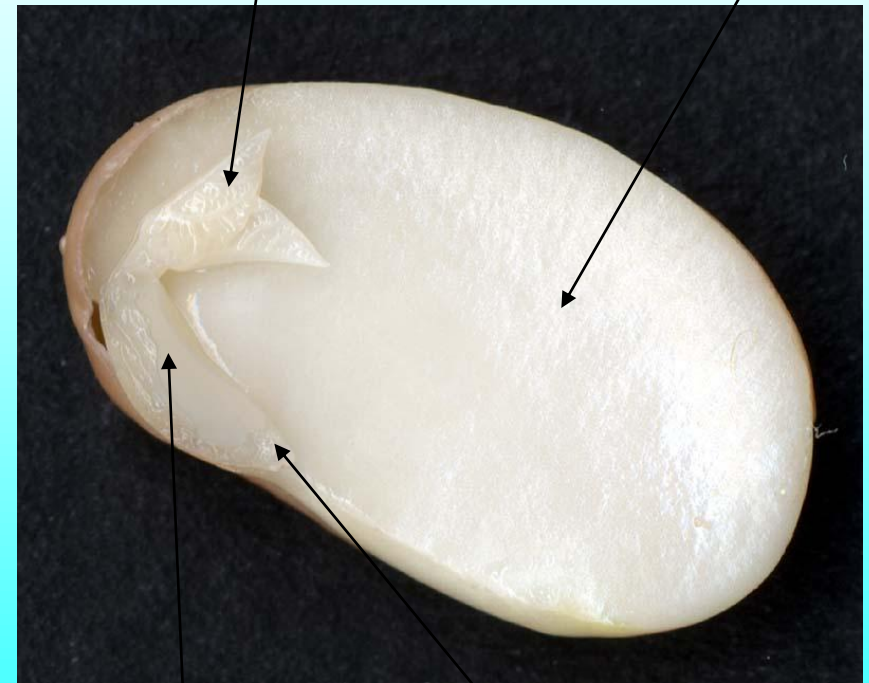


cikatrikula

semenná jizva
pupek = hilum

plumula
apex+pravé listy

děloha
(kotyledon)



hypokotyl

radikula

Kultivace izolovaných zygotických embryí

historie

aplikace

Historický přehled experimentů

Bonnet (1754) - klíčení zárodků fazolu zbavených děloh

Sachs - 19. stol.- špatné klíčení embryí bez endospermu

van Tieghem - pěstování izolovaných embryí na rozetřeném endospermu jiného druhu

Brown a Morris (1890) - transplantace embryí ječmene do endospermu pšenice

Hannig (1904) - izolace nezralých i zralých embryí
Raphanus a *Cochlearia*

Knudson (1920 - 1930) výsevy semen *Orchidaceae* (semena s malými embryi) - kultivace na agarovém médiu s cukrem bez symbiotických hub

Dietrich (1924) - možnost zkrácení dormance

Historický přehled

Raghavan - experimentální embryologie

Torrey

Monnier - izolace globulárních embryí *Capsella*

Norstog - kultivace izolovaných embryí obilovin

Pret'ová - izolovaná embrya lnu (*Linum*)

Rangaswamy

Bajaj

Zenkler - využití překonání aborce hybridních embryí po opylení *in vitro*



V. Raghavan

1. kultivace izolovaných zralých embryí
2. kultivace proembryí

Kultura izolovaných embryí

aseptické vyjmutí embrya a jeho přenos do vhodného média a optimálních kultivačních podmínek

- relativní snadnost získání embryí bez patogenů (povrchová desinfekce semen nebo plodů)
- semena s tvrdým o semením - měkčení vodou, pak opakovaná desinfekce
- podmínka nutná pro vývoj izolovaných embryí = nepoškození embrya (suspensor) - preparační mikroskop
- výběr média - čím mladší embryo, tím větší nároky

Použití kultur izolovaných embryí

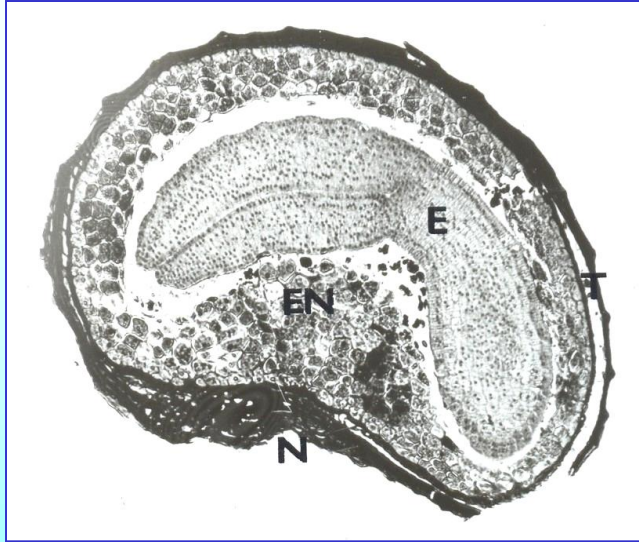
- překonání dormance semen
- překonání aborce embryí po vzdáleném křížení *in situ* nebo *in vitro* („embryo rescue“)

mezidruhové hybridy: bavlník, ječmen, rýže, juta

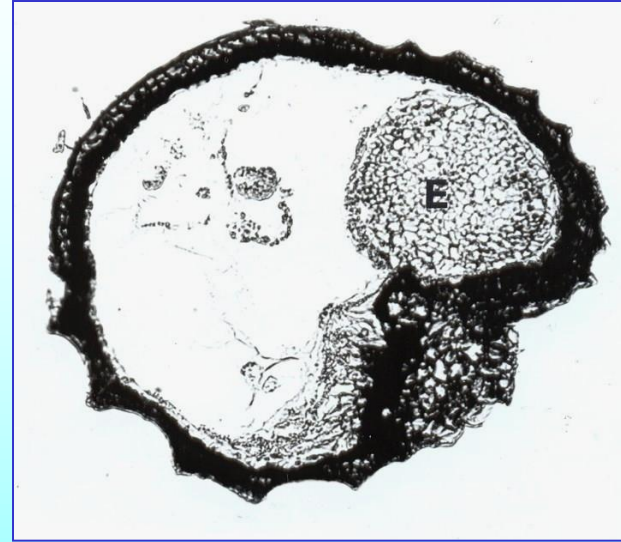
mezirodové hybridy: *Hordeum x Secale*, *Triticum x Secale*, *Hordeum x Hordelymus*, *Tripsacum x Zea*

- monoploidní ječmen
- studie experimentální embryogeneze
- zdroj mladého materiálu pro mikropropagaci

Překonávání aborce embryí po opylování *in vitro*

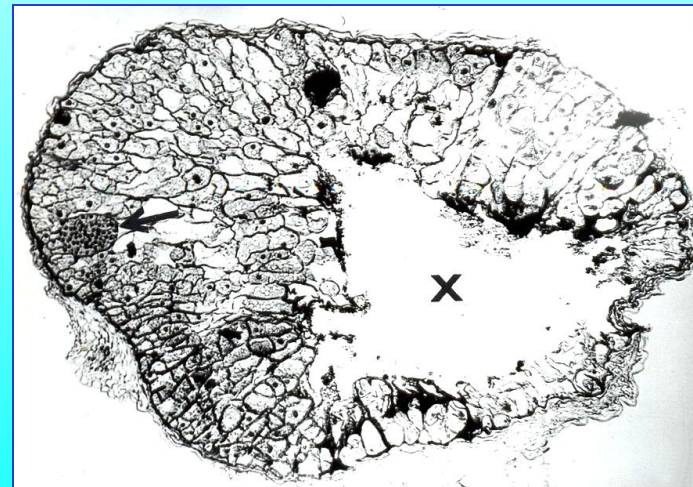
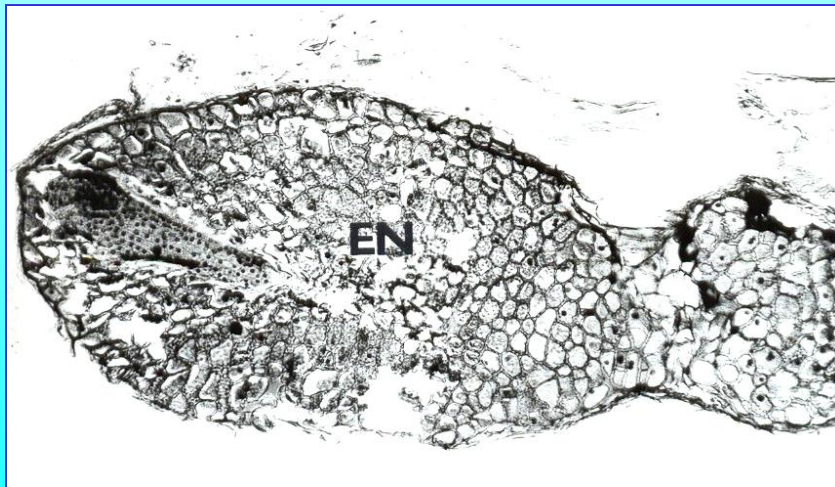


9 MC



Papaver

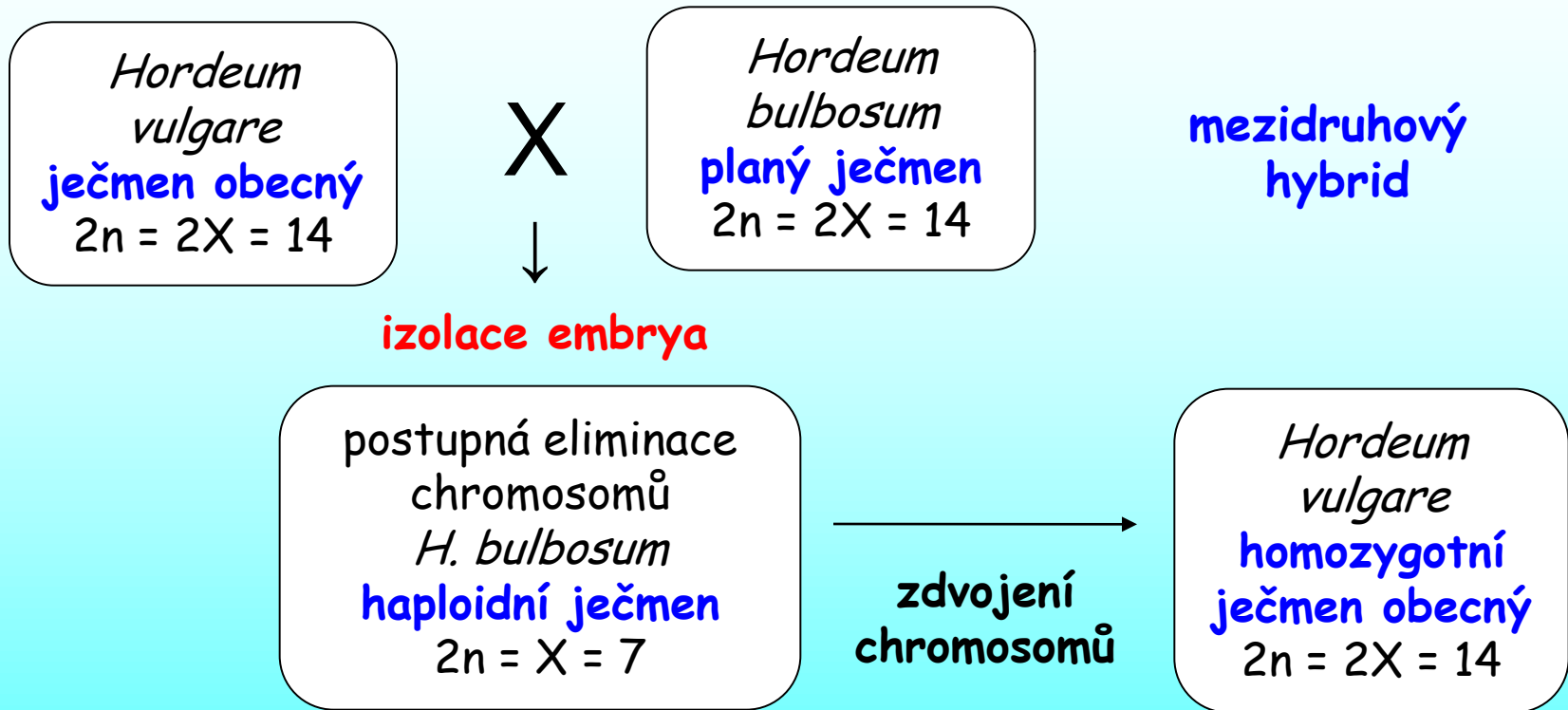
35 DC



Galanthus

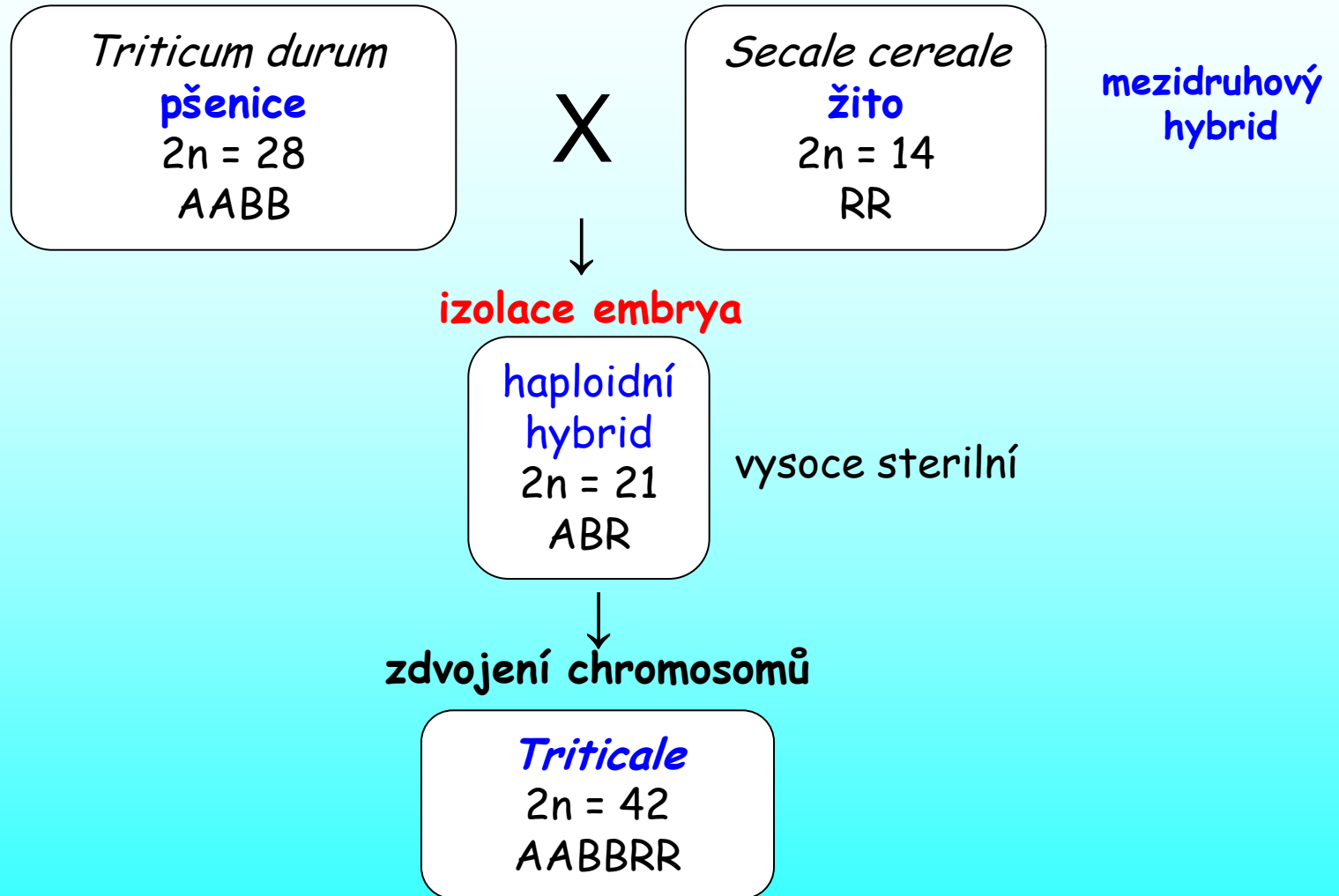
60 DC

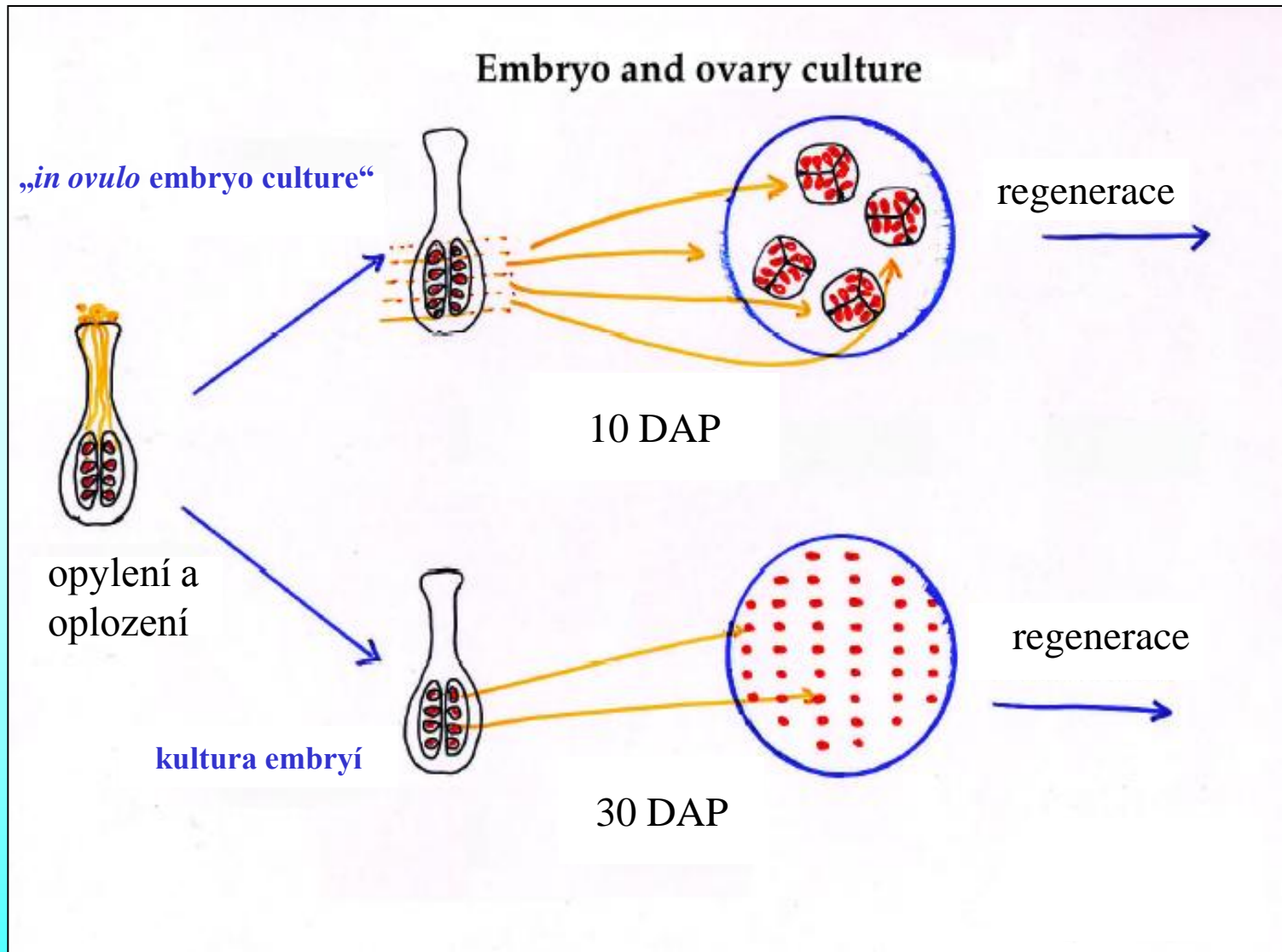
Hordeum bulbosum metoda tvorby haploidů



- **dříve** to byla mnohem účinnější metoda pro tvorbu haploidních rostlinek než mikrosporové kultury (nevýhoda = použití jen u ječmene)
- **nyní**, při použití zlepšeného složení média (sacharosa nahrazena maltosou), je mikrosporová kultura mnohem účinnější (~2000 rostlin ze 100 prašníků)

Příklad získání alopolyloidů



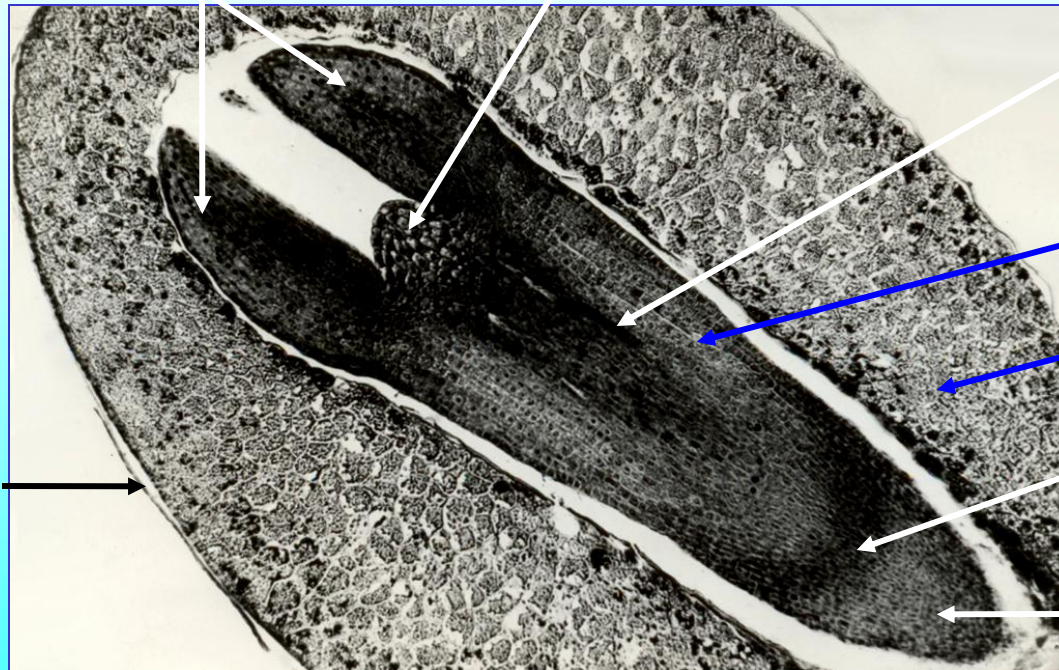


Lammerts van Bueren *et al.*, Luis Bolk Instituut

Podélný řez semenem modřínu *Larix dexidua* (L.) MILL.

dělohy

SAM



hypokotyl

embryo

haploidní megagametofyt
(primární endosperm)

„RAM“

kořenová čepička

zbytek
nucelu

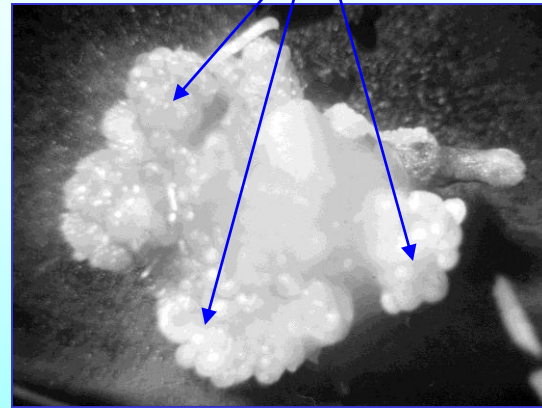
parafínový řez, barveno Heidenheinovým hematoxylinem, o semení odstraněno před procedurou

Mikropropagace konifer z izolovaných embryí

Picea
14 DC
médium s BA



adventivní pupeny na hypokotylu



Larix

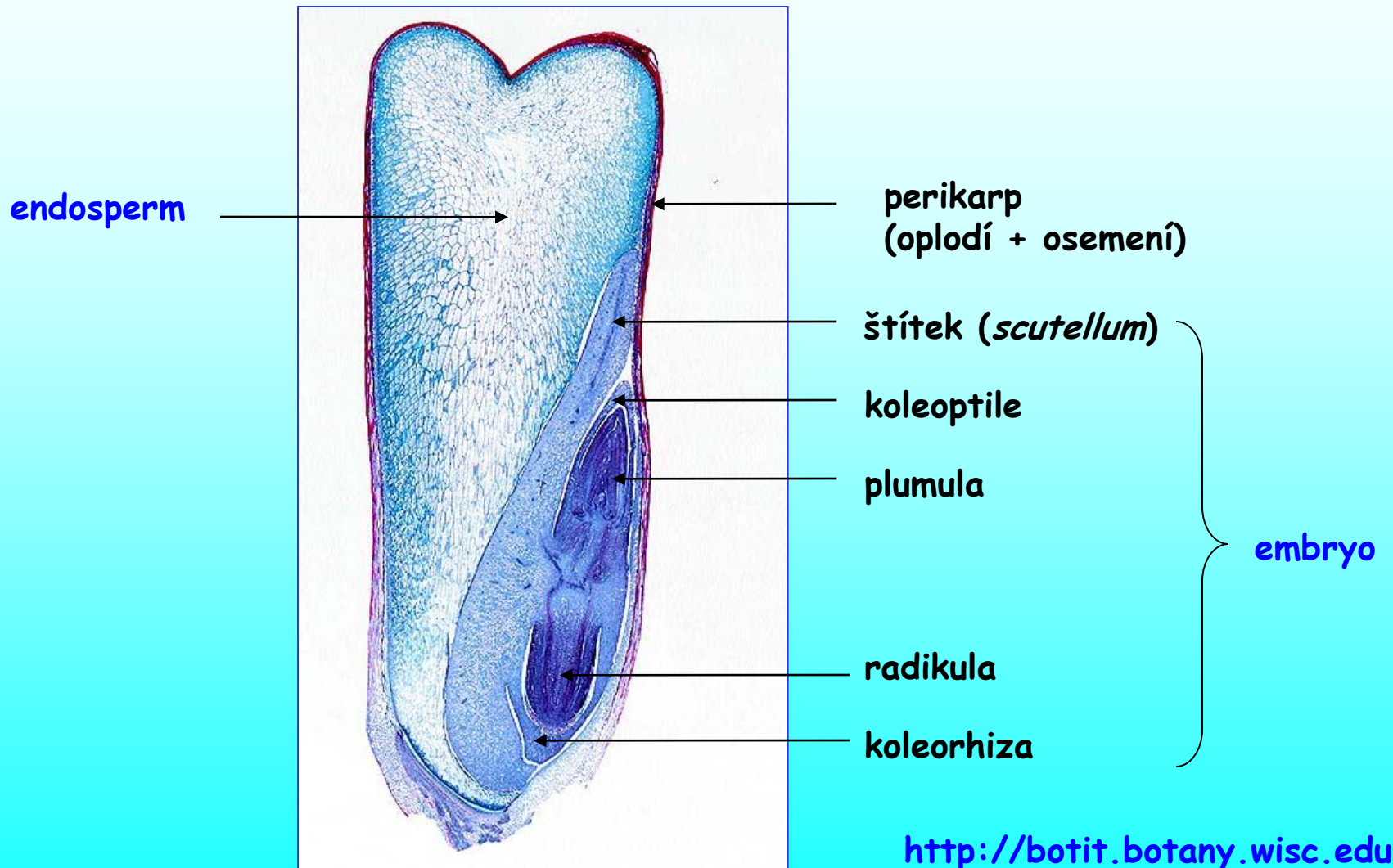


Picea

Kultivace izolovaných embryí konifer (*Picea, Pinus*)

- povrchová desinfekce semen
- bobtnání semen ve sterilní destilované vodě přes noc
- opakování povrchové desinfekce semen
- sterilní izolace embryí
- inokulace embryí na povrch agarem ztuženého média M-S s přidavkem auxinu NAA a cytokininu BA (1F), kontrola M-S (1).

Podélný řez obilkou stavba embrya kukuřice (*Zea mays* L.)



Izolace a kultivace embryí kukuřice (*Zea mays* L.)

- povrchová desinfekce obilek
- bobtnání obilek ve sterilní destilované vodě přes noc
- opakování povrchové desinfekce obilek
- sterilní izolace embryí
- inokulace embryí na povrch agarem ztuženého média M-S.
- hodnocení experimentu - rychlost růstu klíčnicích rostlin (délka kořenů a prýtlů)

Somatická embryogeneze 9.

definice, historie objevu
iniciace
využití



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Somatická (adventivní) embryogeneze

vývoj bipolární struktury embryonálními stadii **bez fúze gamet**

1. spontánní SE *in vivo*

somatická pletiva - kapradiny, orchideje, *Kalanchoe*

reprodukční pletiva - *Citrus, Mango*

2. indukovaná SE *in vitro*

nepřímá - přes stadium kalusu

přímá - meristémy, zygotická embrya, klíčící rostliny

Totipotence somatických buněk

Každá buňka obsahuje celou sadu genetických informací, které jsou nezbytné k vytvoření celé rostliny. Časová a prostorová exprese genů je přesně regulována, aby došlo k diferenciaci různých orgánů.

Indukce SE musí sestávat z ukončení exprese genů vedoucích k diferenciaci orgánů a jejich nahrazení embryogenním programem („přepnutí morfogenetického programu“)

auxiny

2,4-D

picloram

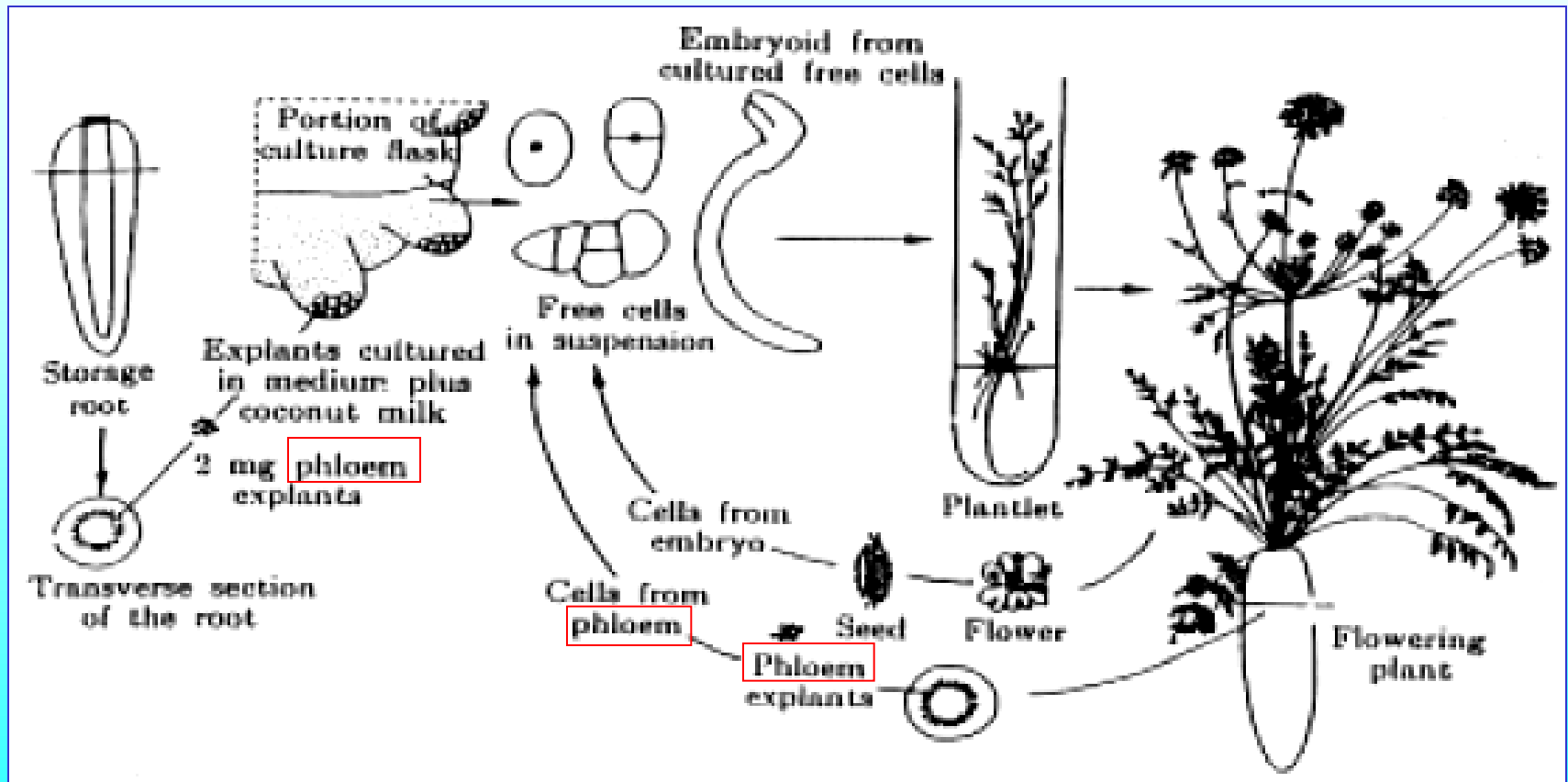
Co víme o somatické embryogenezi a na co se musí výzkum koncentrovat

Základní požadavky jsou obecně platné i pro zygotickou embryogenezi = regulace dělení a diferenciací pletiv

Požadavky na indukci somatické embryogeneze:

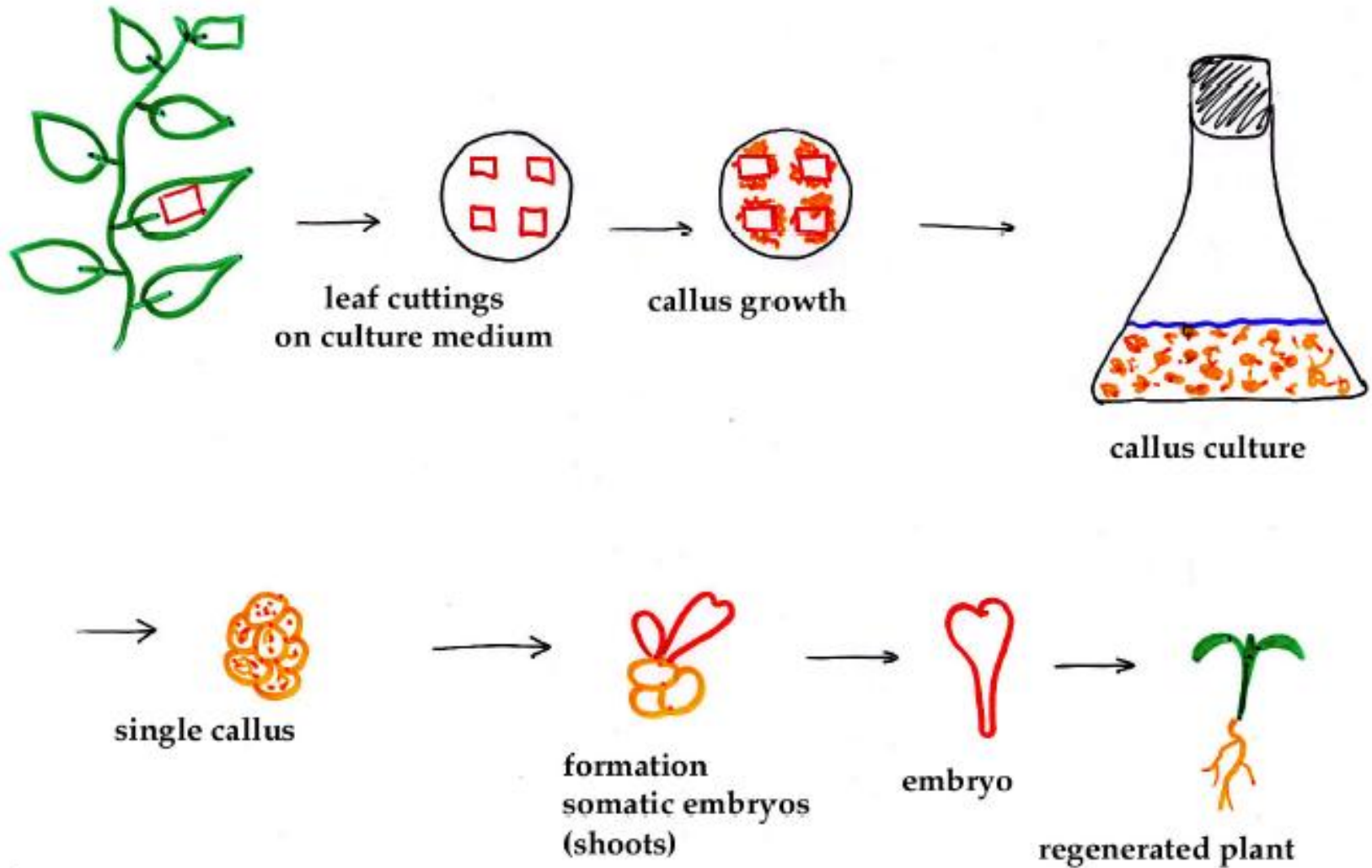
- kompetentní buňky
- vhodné prostředí
- stimul

Produkce somatických embryí odvozených od kořenových explantátů mrkve



Steward *et al.* Science, 143, p. 20-27, 1964

Somatic embryogenesis



Somatic embryogenesis of *Daucus carota*: standard protocol

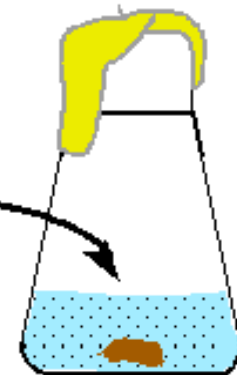
(Ammirato, 1983)



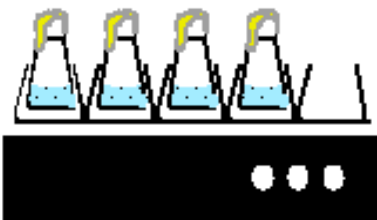
Place 0.5-1 cm petiole explant or 0.5cm³ storage root explant on MS agar medium + 4.5 μM 2,4-D



After 4 weeks growth (dark or lighted) there is enough callus



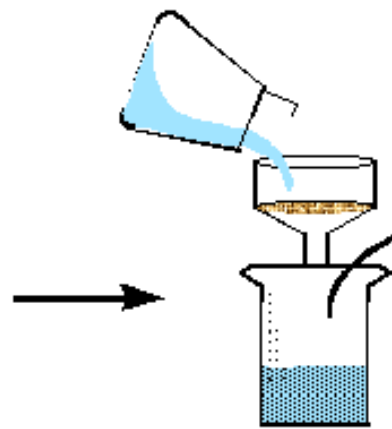
Subculture 2.0 -3.0 g of callus into 50ml of MS liquid medium + 4.5 μM 2,4-D contained in a 250 ml Erlenmeyer flask



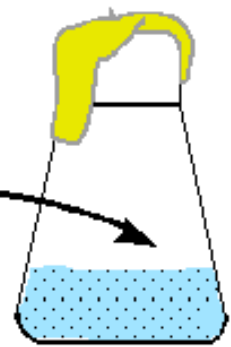
Erlenmeyers are placed on a gyrotary shaker and maintained at 25°C and agitated 125-160 rpm

Subculture every 14-18 days

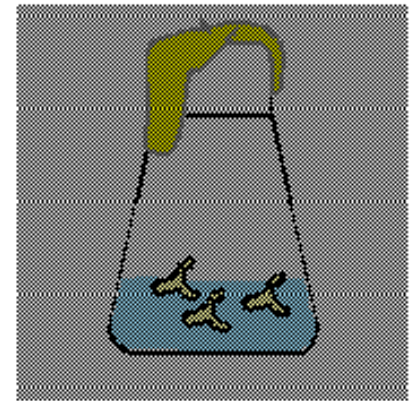
Aseptically aspirate and/ or decant the stale medium and resuspend the cells onto culture medium devoid of 2,4-D for initiation of embryo development



Pass the proembryo suspension through a series of mesh sieves for a uniform embryo population.



Transfer the washed and sieved suspension to 50ml of MS basal medium in Erlenmeyers. For more normal embryo development and to inhibit precocious germination, especially root elongation, 0.1-1 μ M ABA can be added



For more normal development cultures should be grown in darkness. Embryos should appear in about 8 days and reach mature size in 10-15 days

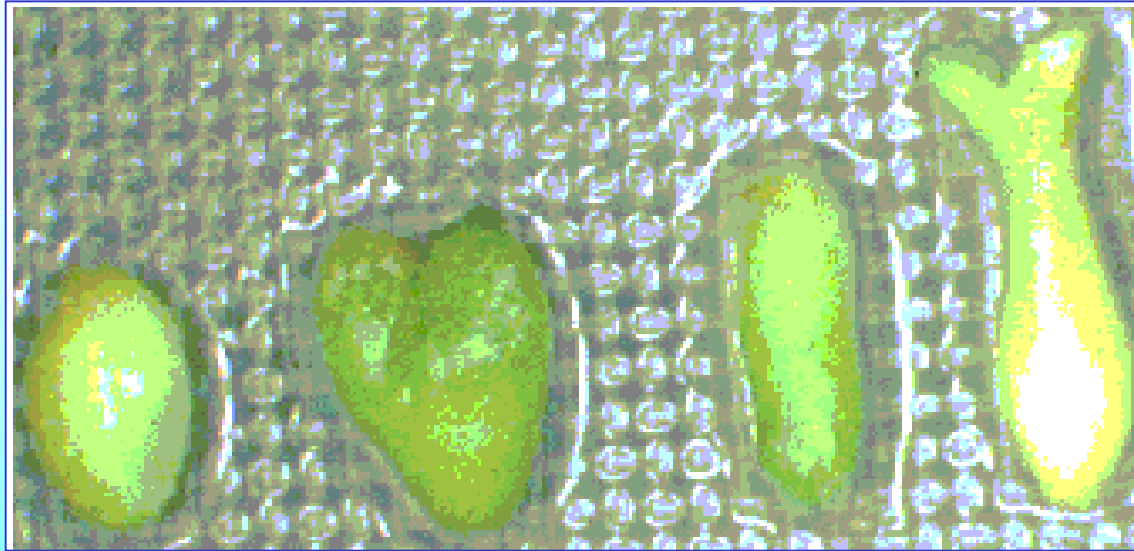


Somatic embryos can be placed out on agar medium devoid of 2,4-D for plantlet development



Plantlets are transferred to Jiffy pots or vermiculite for subsequent development

Vývojová stadia somatických embryí



globulární

srdcovité

torpédovité

kotyledonární

Zrání somatických embryí a desikace

- **předčasné klíčení** = torpédovité embryo pokračuje v růstu do klíčící rostlinky **bez fáze dozrávání** = chybí zásobní látky a tolerance k vyschnutí
- akumulace zásobních proteinů
- nárůst obsahu kyseliny abscisové
- dehydratace



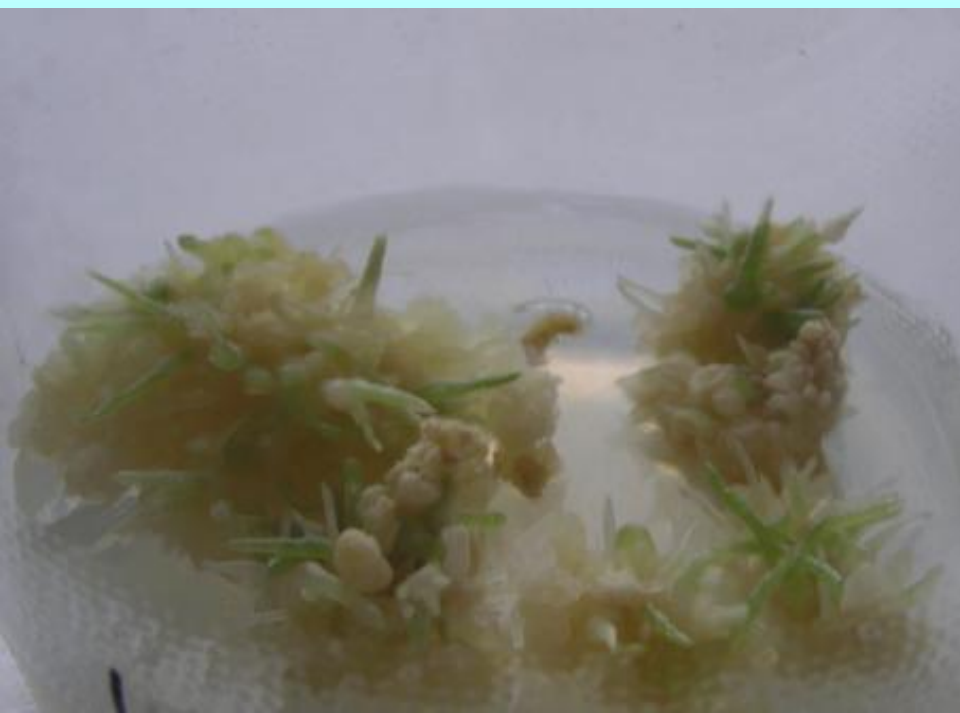
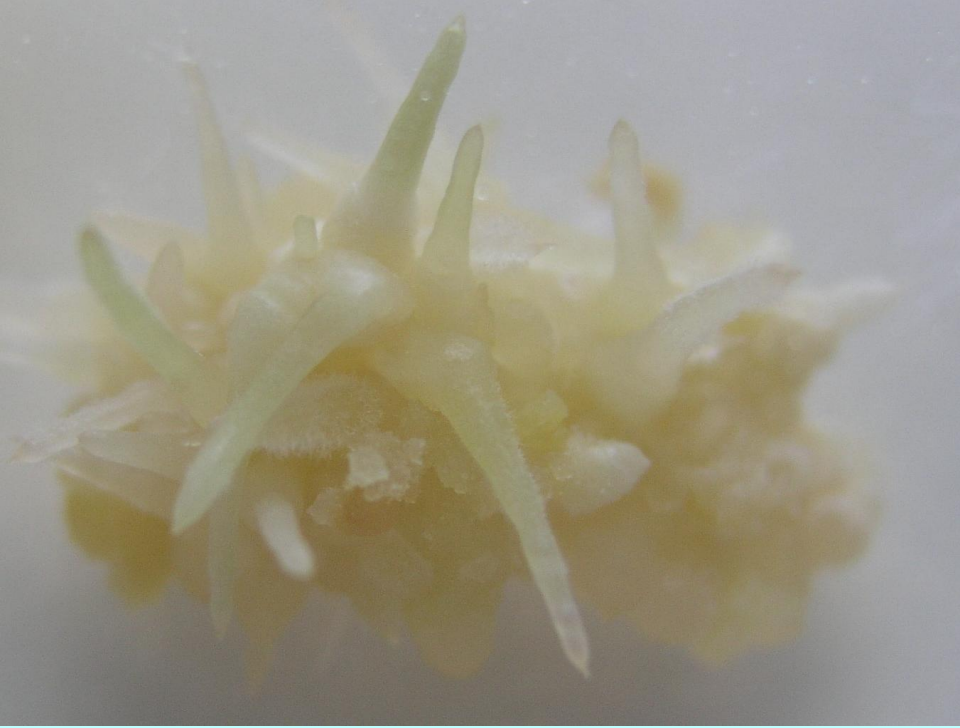
Nepřímá somatická embryogeneze

Debergh *et al.*

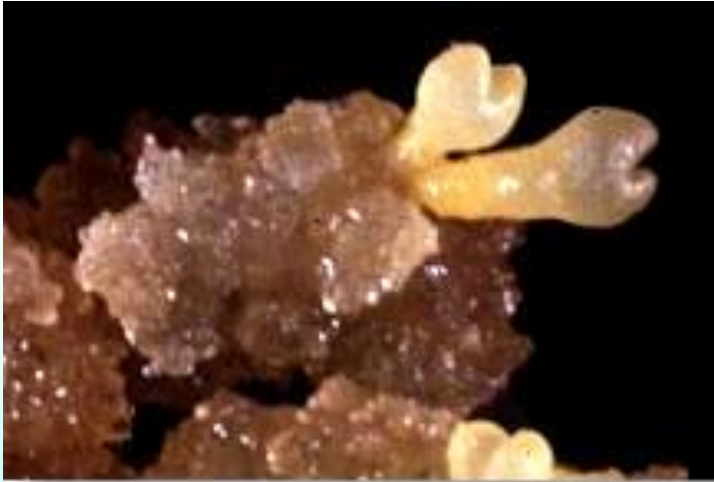
somatická embrya *Aesculus hippocastaneum*
odvozená z květenství

Nepřímá somatická embryogeneze

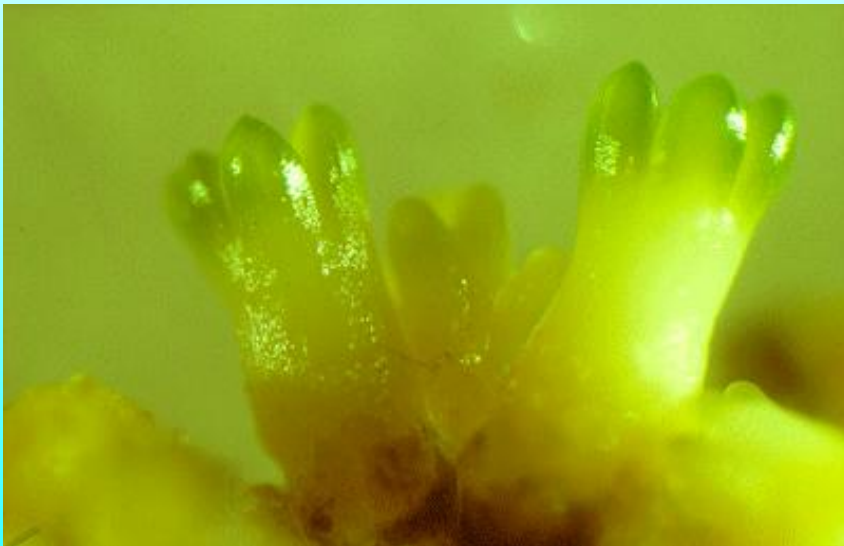
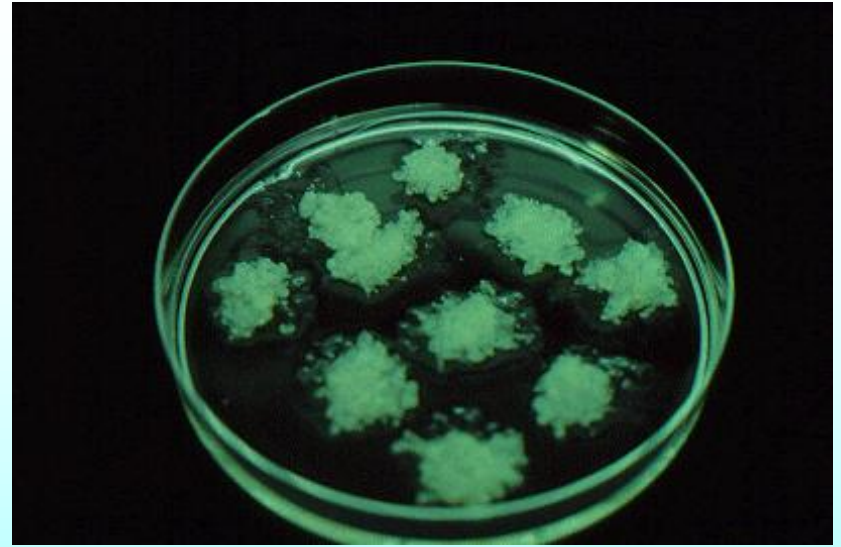
na kalusu Inu



Somatic embryogenesis in trees



Hevea brasiliensis



spruce (*Picea sitchensis*) (Foto: Dr. P.Krogstrup)

Jednobuněčný *versus* mnohobuněčný původ SE

Haccius (1978)

SE - nová individua vznikající z jedné buňky a jsou bez spojení s cévními svazky mateřského pletiva

Raghavan (1976) a jiní

mnoho případů, kde zjevně bipolární embryoidy vznikly z agregátů buněk

Maheswaran et Williams (1985) - u přímé SE existuje gradient spojený s postupnou diferenciací pletiv - viz schéma

Rozdíly mezi přímou a nepřímou SE (Sharp *et al.* 1980)

přímá SE - embryogenní buňky jsou již přítomny na explantátu = **pre-embryogenně determinované buňky (PEDC)**, které potřebují pouze vhodné podmínky, aby došlo k expresi embryogeneze

nepřímá SE - napřed musí dojít k redeterminaci diferencovaných buněk = proliferace kalusu a v něm u části buněk se uskuteční **indukce embryogenně determinovaného stavu (IEDC)**

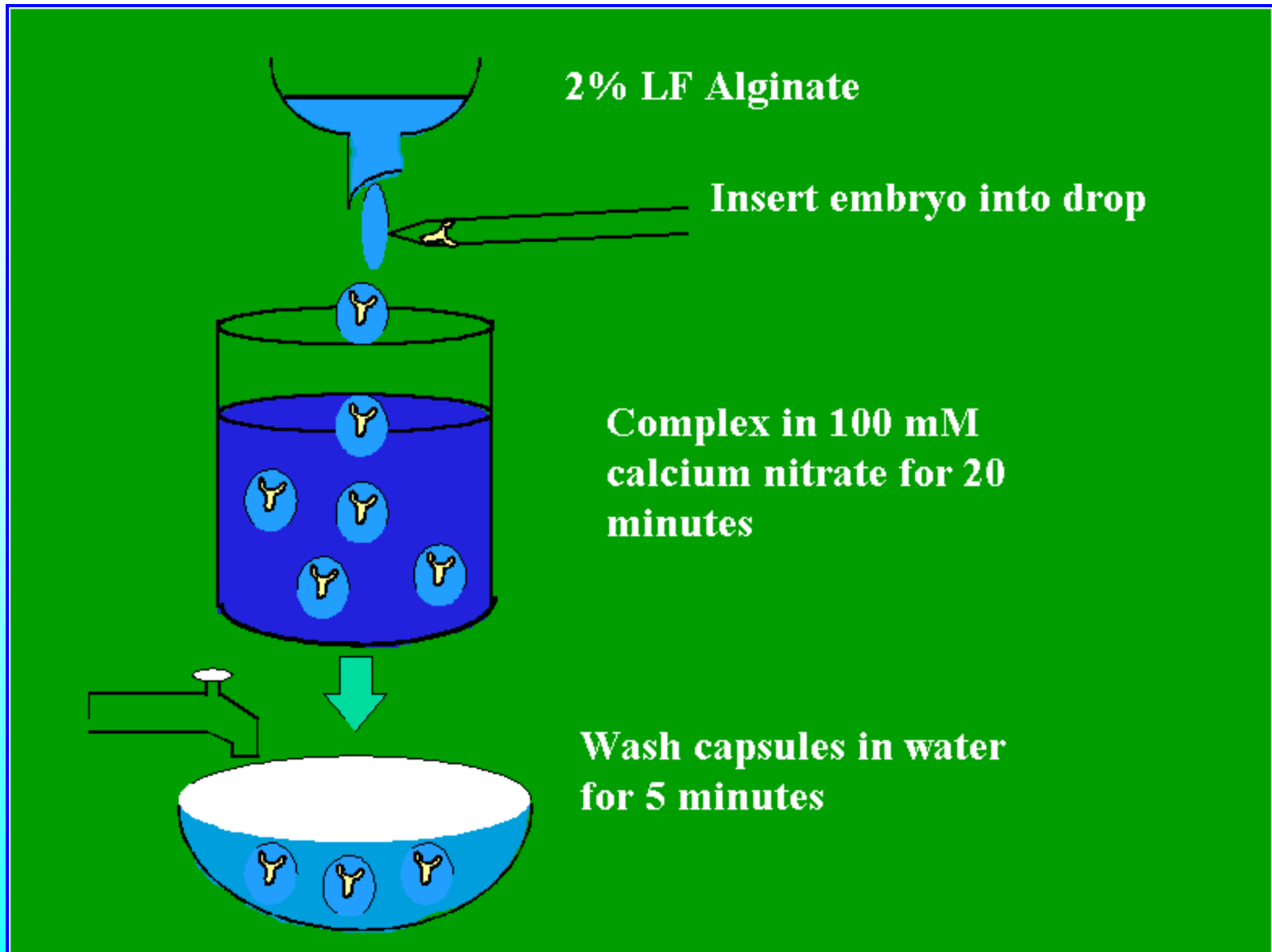
Syntetická neboli umělá semena

- jednotlivá enkapsulovaná somatická embrya
- termín '**embling**' se často používal pro označení rostlinek pocházejících ze somatických embryí nebo syntetických semen.
- pro enkapsulaci embrya se používá **Na-alginát** nebo **speciální gely**, které se samovolně rozkládají

limitující faktory pro širší použití a tvorbu umělých semen ve větším měřítku:

- **kvalita a pravidelná tvorba somatických embryí**
- **konverze embryí**

Příprava umělých semen



Umělá semena

Debergh et al.



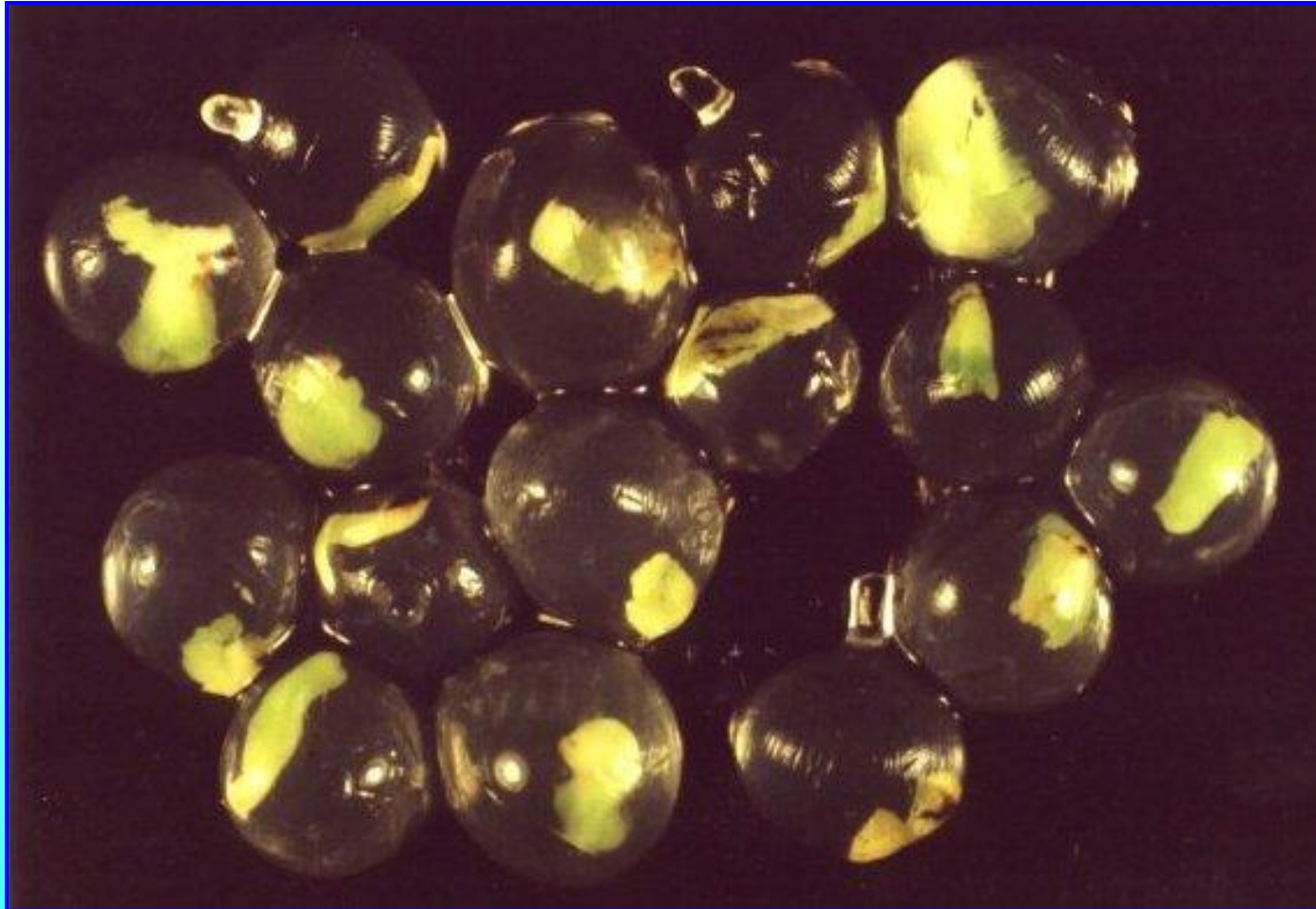
embryo enkapsulované
v alginátu sodném

Problémy:

nepravidelnosti utváření SE (často nedokonale
vyvinutá SE, absence meristému, velké interceluláry,
absence zásobních látek a ABA)

konverze

Somatické embryá sóje enkapsulovaná v alginátu



Dr. M. Griga, Agritec s.r.o. Šumperk

<http://people.whitman.edu/~vernondm/embryo/plant.html>

embryogeneze *Arabidopsis*

<http://bibd.uni-giessen.de/ghm/2000/uni/p000004.htm>

somatická embryogeneze a biotechnologie

<http://www.cirad.fr/presentation/programmes/biotrop/resultats/bio sitecirad/es.htm>

somatická embryogeneze – kaučukovník, rýže, banánovník aj.

<http://www.botanic-garden.ku.dk/eng/forskning/vaev2.htm>

somatická embryogeneze – jehličnany

Využití SE - praktické i teoretické

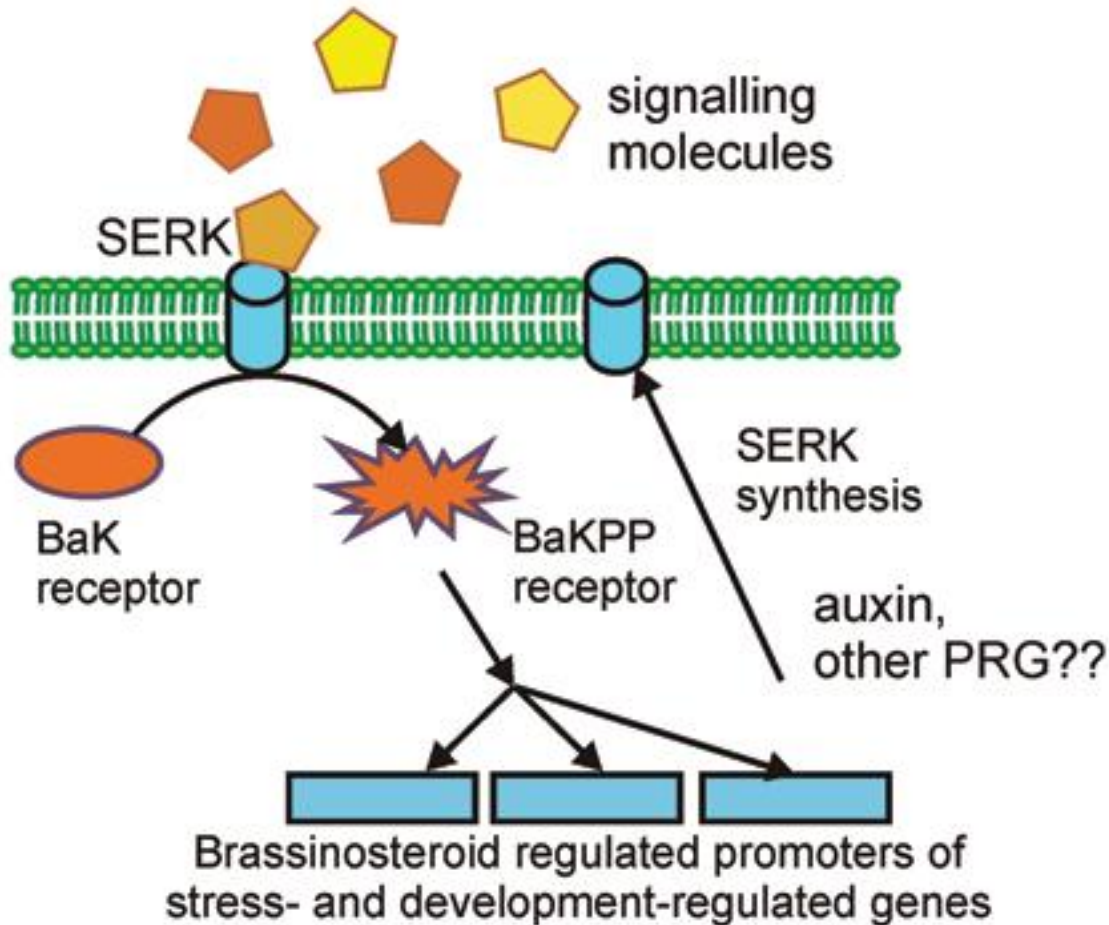
SE je dnes v mnoha laboratořích základní metodikou pro množení transgenních rostlin

cytologické, fyziologické nebo biochemické pozadí její podstaty zatím ale není plně pochopeno

SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) = membránový receptor

praktické aplikace jsou zřejmé, ale SE je stále i objektem základního výzkumu, který by měl vést k pochopení diferenciaci jako jednoho ze základních rysů biologických systémů

Model signalizace SERK (Somatic embryogenic receptor kinase)



SERK protein
fosforyluje
brasinosteroidové
receptory

Santos et Aragajo
(2009)

Otázky pro další výzkum

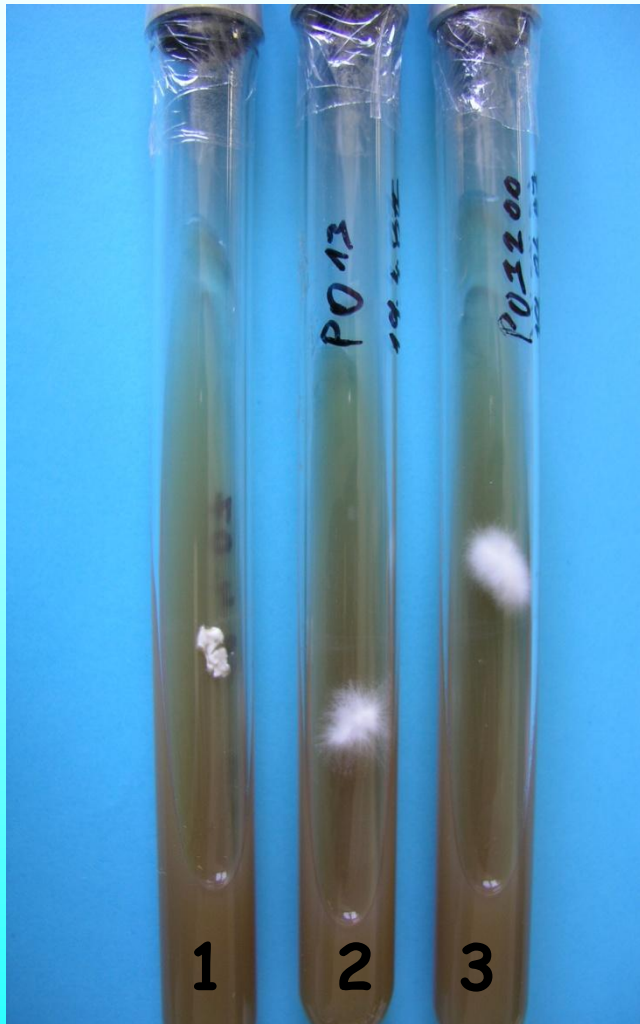
1. Co je podstatou konstituce embryogenní kompetence na buněčné a molekulární úrovni?
2. Jak jsou embryogenně kompetentní buňky produkovány během ontogeneze rostlin?
3. Molekulární organizace programu somatické embryogeneze a její realizace
4. Jaká je povaha stimulu, který indukuje program embryogeneze u kompetentních buněk?

Kultivace dřevokazných hub

Příklad suspenzní kultury

- uchování čisté kultury mycelia na šikmém agar-sladu (pasáž 1x ročně) **tma, 4°C**
- nárůst hmoty mycelia - Petriho misky s agar-sladovým médiem **termostat, tma, 25°C**
- pasáž mycelia na povrch skleněných perel s 3% sladem **termostat, tma, 25°C**
- roztřepání mycelia a inokulace do 3% sladu **třepačka, 25°C**
- inokulace substrátu nasyceného 3% sladem **termostat, tma, 25°C**
- indukce tvorby plodnic **chladový šok**

Kultivace dřevokazných hub



Lentinus tigrinus - houževnatec tygrovaný
(1)

Pleurotus ostreatus - hlíva ústříčná
(2, 3)

růst mycelia na šikmém agaru ve zkumavce
1 týden po pasáži na agar - sladové
médium

(tma, 25°C)

Kultivace dřevokazných hub



Pleurotus ostreatus - hlíva ústříčná

růst mycelia na Petriho misce

2 týdny po pasáži na agar - sladové médium

(tma, 25°C)

Kultivace dřevokazných hub



Pleurotus ostreatus - hlíva ústříčná

růst mycelia na sleněných perlách
2 týdny po pasáži na 3% sladové médium

(tma, 25°C)

Pleurotus ostreatus - hlíva ústříčná



plodnice

kukuřičné šustí a vřetena nasycená sladovým roztokem